

DEHIDRASI DAN PEMBEKUAN JARINGAN APEKS TEBU UNTUK PENYIMPANAN JANGKA PANJANG

The Dehydration and Freezing of Sugarcane Apex Tissues for Long-Term Conservation

IKA ROOSTIKA ¹⁾, RARA PUSPITA DEWI LIMA WATI ²⁾, dan DARDA EFENDI ²⁾

¹⁾Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi
dan Sumberdaya Genetik Pertanian,
Jalan Tentara Pelajar 3A Bogor, 16111

²⁾Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian,
Institut Pertanian Bogor,
Jalan Meranti No. 1, Kampus IPB Dramaga Bogor, 16680

e-mail: ikatambunan@yahoo.com

(Diterima: 27-11-2014; Direvisi: 3-2-2015; Disetujui: 20-2-2015)

ABSTRAK

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan tanaman yang diperbanyak secara vegetatif. Kriopreservasi merupakan metode yang paling sesuai untuk penyimpanan jangka panjang bagi tanaman yang diperbanyak secara vegetatif. Dehidrasi dan pembekuan jaringan merupakan tahapan paling kritis yang menentukan keberhasilan kriopreservasi. Tujuan penelitian adalah untuk memperoleh durasi dehidrasi yang optimal dan metode pembekuan jaringan apeks tebu. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor pada Mei 2013 sampai Februari 2014. Untuk optimasi metode dehidrasi, apeks direndam dalam larutan PVS2 (MS + gliserol 30% + etilen glikol 15% + dimetil sulfoksida 15% + sukrosa 0,4 M) selama 10, 20, 30, dan 40 menit. Untuk optimasi metode pembekuan, diujikan kombinasi perlakuan prakultur (dengan sukrosa 0; 0,1; dan 0,3 M selama 5 hari) dan pemuatan dalam larutan LS (MS + gliserol 2 M + sukrosa 0,4 M) selama 0, 10, 20, dan 30 menit sebelum tahapan dehidrasi dan pembekuan jaringan di dalam nitrogen cair (-196°C). Hasil penelitian menunjukkan durasi dehidrasi jaringan yang terbaik adalah 30 menit dalam larutan PVS2. Kombinasi perlakuan prakultur dengan sukrosa 0,3 M dan pemuatan dengan larutan LS selama 10 menit merupakan metode terbaik untuk pembekuan jaringan. Persentase tumbuh sebelum dan setelah pembekuan dalam nitrogen cair berturut-turut adalah 100 dan 40%. Setelah kriopreservasi, biakan mampu tumbuh dengan tingkat multiplikasi tunas sekitar 10 tunas/eksplan. Metode yang diperoleh pada penelitian ini berpeluang diterapkan untuk penyimpanan plasma nutfah tebu dalam jangka panjang secara kriopreservasi dan eliminasi patogen obligat secara krioterapi.

Kata kunci: *Saccharum officinarum* L., apeks, dehidrasi, pembekuan, nitrogen cair

ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is vegetatively propagated plant. Cryopreservation is the most suitable method for long-term preservation of vegetatively propagated plant. Dehydration and freezing are critical steps of successful cryopreservation so that it should be optimized. The research aimed to obtain the optimal duration of dehydration and freezing method of sugarcane apex tissues. The experiments were conducted at Tissue Culture Laboratory, Plant Cell Tissue Biology Group, Indonesian Center for Agricultural Biotechnology

and Genetic Resources Research and Development on May 2013–February 2014. To optimize dehydration method, the tissues were exposed in PVS2 solution (MS + 30% glycerol + 15% ethylene glycol + 15% dimethyl sulphoxide + 0.4 M sucrose) for 10, 20, 30, and 40 minutes. To optimize freezing method, the combined treatment of preculture with sucrose (0, 0.1, dan 0.3 M) for 5 days and loading in LS solution (MS + 2 M glycerol + 0.4 M sucrose) for 0, 10, 20, dan 30 minutes) were tested before dehydration for 30 minutes and freezing in liquid nitrogen (-196°C). The best duration of dehydration was 30 minutes. The combined treatment of preculture on 0.3 M sucrose and loading for 10 minutes was the best method for tissues freezing. Percentage of regrowth before and after freezing in liquid nitrogen was 100 and 40% respectively. After cryopreservation, the cultures could grow with high shoot multiplication rate about 10 shoots/explant. The method resulted in this study can be applied for long-term storage of sugarcane germplasms by cryopreservation and (elimination of obligate pathogens by cryotherapy).

Keywords: *Saccharum officinarum* L., apex, dehydration, freezing, liquid nitrogen.

PENDAHULUAN

Tebu adalah tanaman yang diperbanyak secara vegetatif. Kriopreservasi merupakan cara yang paling sesuai diterapkan untuk penyimpanan jangka panjang bagi tanaman yang diperbanyak secara vegetatif (ROOSTIKA dan MARISKA, 2004). Metode tersebut telah diterapkan secara rutin untuk penyimpanan jangka panjang berbagai jenis tanaman di bank gen, seperti pisang di *International Transit Center* (ITC) Belgia, ubi kayu di *International Centre for Tropical Agriculture* (CIAT) Kolombia, kentang dan uwi di *Institut für Pflanzengenetik und Kultur pflanzenforschung* (IPK) Jerman, kentang di *International Potato Center* (CIP) Peru, serta tanaman buah subtropis di *National Institut of Agrobiological Science* (NIAS) Jepang dan *National Clonal Germplasm Repository* (NCGR) Amerika Serikat (GOLMIRZAEI dan PANTA, 2000; LEUNUFNA, 2004; KELLER et al., 2008; PANIS dan THINH, 2009).

Metode kriopreservasi bahkan juga dapat diterapkan untuk eradikasi patogen obligat, seperti virus, fitoplasma, dan bakteri sehingga disebut sebagai metode *cryotherapy* atau krioterapi (WANG dan VALKONEN, 2012). Teknik tersebut dilaporkan dapat mengeliminasi virus *Grapevine Virus A* (GVA) pada tanaman anggur (WANG *et al.*, 2003), *Sweetpotato Feathery Mottle Virus* (SPFMV) pada tanaman ubi jalar (FENG *et al.*, 2011), *Grapevine Fanleaf Virus* (GLFV), dan *Grape Leafroll Associated Viruses* (GLRaVs) pada tanaman anggur (SHATNAWI *et al.*, 2011).

Pada prinsipnya, proses metabolisme nyaris tidak terjadi sama sekali apabila jaringan tanaman disimpan pada suhu ultra rendah (-160 hingga -200°C) dalam nitrogen uap, cair, atau yang terpadatkan. Oleh karena itu, bahan tanaman dapat disimpan selama puluhan tahun. Pada kondisi suhu ultra rendah tersebut, jaringan yang berada di area primordia daun dan basal pucuk akan mati, sedangkan area meristem tetap hidup sehingga patogen yang bersifat obligat juga akan mati atau tereliminasi (FENG *et al.*, 2011).

Dehidrasi merupakan tahapan yang paling kritis pada kegiatan kriopreservasi. Jika dehidrasi terjadi secara berlebihan maka jaringan dapat mengalami kematian karena terjadi plasmolisis yang bersifat *irreversible* (tak dapat balik). Pada kondisi tersebut, terjadi perubahan pH, interaksi makromolekuler, dan peningkatan konsentrasi zat elektrolit (REINHOUD *et al.*, 2000) sehingga pemulihan tidak dapat terjadi. Sebaliknya, jika jaringan kurang mengalami dehidrasi, maka air yang banyak terkandung di dalam sel berpotensi menyebabkan terjadinya formasi es ekstraseluler dan intraseluler selama pembekuan. Pembentukan kristal es selama pembekuan sangat tidak diharapkan dalam kriopreservasi karena dapat menyebabkan kebocoran membran sel. Formasi es intraseluler pada umumnya dilaporkan bersifat letal (ROOSTIKA dan MARISKA, 2004). Selain itu, formasi es ekstraseluler juga dapat merusak sel karena daya mekanis kristal es yang tumbuh, gaya adesi kristal es terhadap membran, interaksi listrik yang disebabkan oleh perbedaan solubilitas ion pada fase es dan cair, formasi gelembung udara intraseluler, luka yang berhubungan dengan aktivitas lipid peroksidase, dan perubahan pH pada lokasi tertentu. Oleh karena itu, dehidrasi perlu dioptimasi terlebih dahulu. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh durasi dehidrasi yang optimal, serta metode pembekuan jaringan apeks tebu yang berguna untuk penyimpanan jangka panjang secara kriopreservasi dan krioterapi tanaman tebu yang terinfeksi patogen obligat.

METODOLOGI

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor pada bulan Mei 2013 sampai Februari 2014. Penelitian dibagi dalam dua tahap, yaitu dehidrasi dan pembekuan jaringan apeks.

Bahan tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah tebu PS864 yang diperoleh dari Kebun Percobaan Cibinong milik Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan karena memiliki respon *in vitro* yang baik sehingga ideal sebagai tanaman model. Selain itu, PS864 merupakan salah satu varietas komersial yang banyak dibudidayakan di Indonesia dan yang banyak terserang virus mosaik (PUTRA dan DAMAYANTI, 2009).

Kriopreservasi yang digunakan pada penelitian ini adalah teknik vitrifikasi. Vitrifikasi adalah salah satu teknik baru dalam kriopreservasi melalui pembekuan secara cepat (perendaman secara langsung dalam nitrogen cair) sehingga akan terbentuk struktur gelas yang amorf pada saat pembekuan di dalam nitrogen cair (ROOSTIKA dan MARISKA, 2004). Secara ringkas, tahapan kriopreservasi secara vitrifikasi meliputi *preculture* (prakultur), *loading* (pemuatan), *dehydration* (dehidrasi), *freezing* (pembekuan), *thawing* (pelelehan), *deloading* (penggantian muatan), *recovery* (pemulihan), dan *regeneration* (regenerasi) (ROOSTIKA dan MARISKA, 2004).

Preparasi Biakan Induk

Sterilisasi dilakukan dengan mencelupkan stek tebu ke dalam larutan alkohol 96% kemudian membakarnya dengan api dari lampu spiritus. Pucuk dan nodus diisolasi dan ditanam pada media regenerasi, yaitu media MS yang mengandung *benzyl adenine* (BA) 0,3 mg/l dan *indole butyric acid* (IBA) 0,5 mg/l. Subkultur pada media yang sama dilakukan setiap satu bulan untuk menginduksi multiplikasi tunas *in vitro*. Sebagai biakan induk, digunakan tunas *in vitro* tebu yang telah disubkultur lima dan enam kali (SK5 dan SK6). Sumber eksplan yang digunakan pada percobaan ini adalah biakan yang berumur dua minggu setelah subkultur (MST).

Optimasi Metode Dehidrasi Jaringan Apeks

Rancangan percobaan yang digunakan pada tahap ini adalah Acak Lengkap (RAL) dengan lima ulangan. Eksplan yang digunakan adalah apeks, yaitu meristem beserta 3 sampai 5 primordia daun yang berukuran sekitar 0,3-0,5 mm. Sebanyak sepuluh eksplan dimasukkan dalam *cryotube* ukuran 2 ml. Dehidrasi jaringan dilakukan dengan merendam eksplan tersebut dengan 1,5 ml larutan PVS2. Larutan PVS2 merupakan media MS yang mengandung *glycerol* (Gly) 30%, *ethylene glycol* (EG) 15%, *dimethyl sulphoxide* (DMSO) 15%, dan sukrosa 0,4 M. Larutan PVS2 dibuat pada kondisi pH 5,8. Dehidrasi dilakukan selama 0, 10, 20, 30, dan 40 menit. Setiap ulangan terdiri 10 eksplan sehingga total jumlah sampel adalah 150 eksplan. Setelah itu, eksplan direndam dalam larutan MS yang mengandung sukrosa 1,2 M selama 30 menit. Selanjutnya, eksplan ditanam pada media regenerasi (media MS + BA 0,3 mg/l + IBA 0,5 mg/l) yang ditambah dengan *polyvinylpyrrolidone* (PVP) *non soluble* 100 mg/l. Untuk pemulihan, eksplan diinkubasi dalam kondisi gelap selama 1 minggu kemudian diinkubasi pada kondisi terang 1000

lux dengan fotoperiodisitas 16 jam pada suhu 25°C di ruang kultur supaya eksplan dapat beregenerasi. Untuk mengoptimasi daya regenerasi, eksplan ditanam pada media regenerasi dengan kandungan PVP yang lebih tinggi (300 mg/l). Peubah yang diamati adalah daya hidup dan regenerasi, serta jumlah tunas yang terbentuk. Daya hidup ditandai dengan hijaunya apeks. Apeks yang memutih menandakan jaringan tersebut telah mati. Daya regenerasi ditandai dengan tumbuhnya apeks menjadi lebih panjang atau munculnya tunas baru. Perlakuan dehidrasi jaringan yang optimal selanjutnya diterapkan pada percobaan berikutnya. Durasi rendam paling optimal adalah yang paling lama, namun dapat mempertahankan daya hidup melebihi 70%.

Optimasi Metode Pembekuan Jaringan Apeks

Pada tahap ini, terdapat 16 kombinasi perlakuan prakultur dan pemuatan serta terdapat 2 kelompok sampel, yaitu yang direndam dan tanpa direndam dalam nitrogen cair. Setiap perlakuan terdiri atas 5 apeks sehingga pada percobaan ini digunakan eksplan sebanyak 320 apeks.

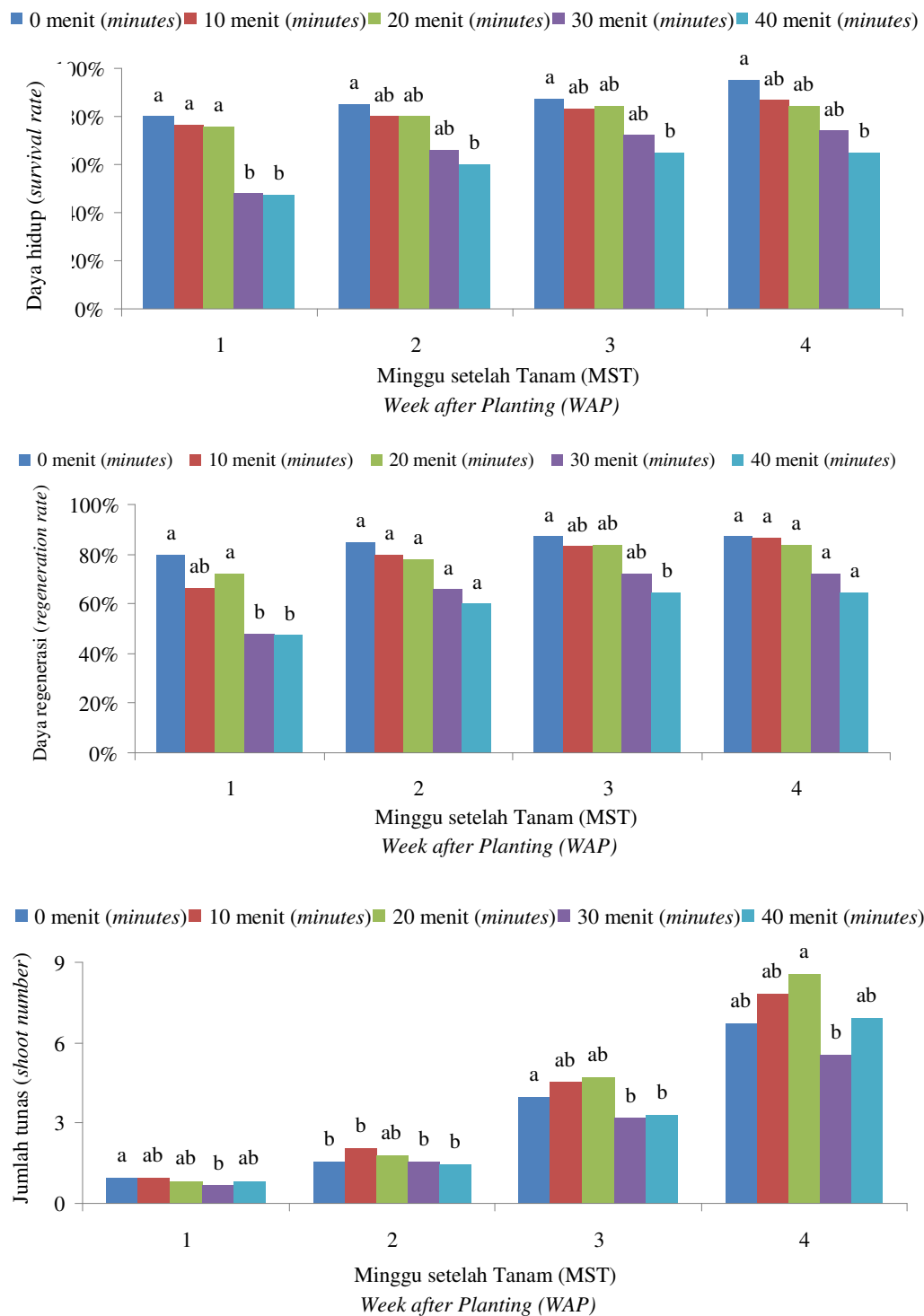
Sebelum proses dehidrasi, eksplan diprakultur pada media MS padat dengan penambahan sukrosa 0; 0,1; 0,3; dan 0,5 M dengan waktu inkubasi selama 5 hari. Setelah prakultur, sebanyak lima eksplan dimasukkan dalam *cryotube* berukuran 2 ml dan diberi perlakuan pemuatan dengan larutan LS (*Loading Solution*) yang berupa media MS yang mengandung gliserol 2 M dan sukrosa 0,4 M. Sebanyak 1,5 ml larutan LS digunakan dalam perlakuan pemuatan dengan durasi 0, 10, 20, dan 30 menit. Setelah proses dehidrasi (dengan menggunakan metode dehidrasi terbaik berdasarkan percobaan pertama), eksplan dibekukan dalam nitrogen cair minimal selama 1 jam. Supaya tidak mengapung pada saat perendaman dalam nitrogen cair, *cryotube* disusun dalam *cryocan*. Sebagai kontrol, eksplan yang telah didehidrasi tidak dibekukan dalam nitrogen cair, namun langsung dilakukan penggantian muatan dan kemudian eksplan dipulihkan dan diregenerasikan pada media regenerasi. Pelelehan dilakukan dengan menggunakan air hangat (40°C). Penggantian muatan dilakukan dalam media MS dengan penambahan 1,2 M selama 30 menit. Selanjutnya, eksplan ditanam pada media MS regenerasi yang *semisolid* (dengan menggunakan *phytagel* 2 g/l). Pada 1 minggu pertama, eksplan diinkubasikan dalam keadaan gelap untuk pemulihan. Selanjutnya, inkubasi dilakukan pada kondisi terang 1000 lux dengan fotoperiodisitas 16 jam pada suhu 25°C di ruang kultur. Peubah yang diamati adalah daya hidup dan regenerasi, serta jumlah tunas yang terbentuk.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi Durasi Dehidrasi Jaringan Apeks

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa apeks yang bertahan hidup cenderung dikelilingi oleh area yang berwarna coklat pada media tumbuhnya, sedangkan yang tidak bertahan hidup dicirikan dengan memudarnya warna hijau menjadi putih. Jaringan apeks tebu mampu bertahan hidup hingga durasi dehidrasi yang terlama (40 menit). Secara umum, daya hidup eksplan dari seluruh perlakuan melebihi 60%, pada 4 minggu setelah tanam (4 MST). Semakin lama durasi rendam dalam larutan PVS2 maka semakin rendah daya hidup dan regenerasi apeks (Gambar 1). Hal yang serupa ditemui pada kriopreservasi purwoceng (ROOSTIKA *et al.*, 2007). Semakin lama jaringan terendam dalam larutan PVS2 maka jaringan akan mengalami dehidrasi semakin parah. Dehidrasi yang berlebihan dapat menyebabkan terjadinya plasmolisis yang bersifat *irreversible* karena membran sel tidak mampu melakukan deplasmolisis. Plasmolisis tersebut menyebabkan membran menjadi tidak berfungsi. Disamping itu, membran sel tidak sanggup menyerap ion-ion di dalam media tumbuh secara selektif sehingga jaringan tidak dapat bertahan hidup.

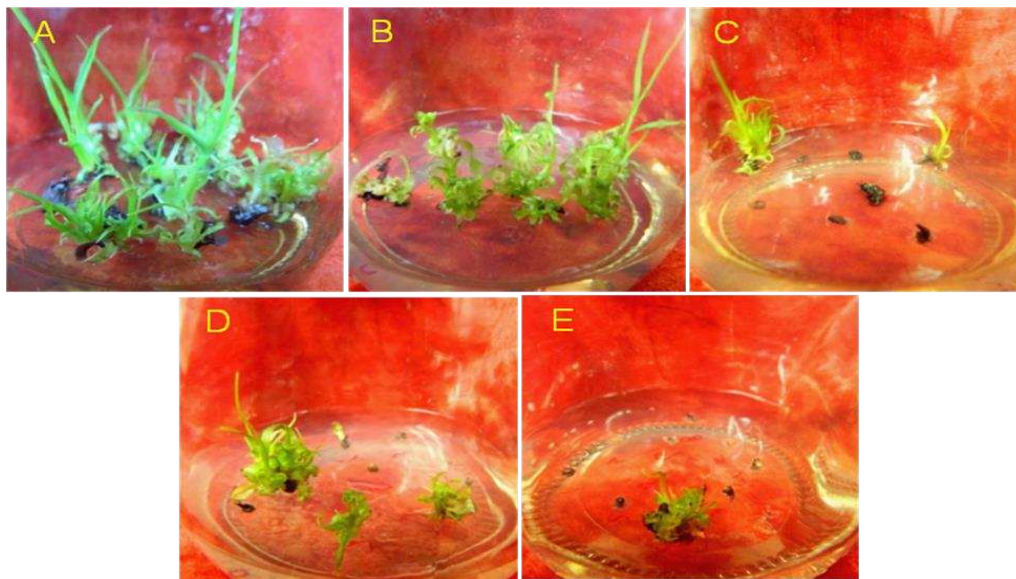
Pada 1 MST, jumlah tunas yang terbentuk dari apeks, yang diberi perlakuan dehidrasi, lebih banyak daripada kontrol. Ukuran tunasnya lebih pendek daripada kontrol. Secara visual, tampak bahwa pencoklatan yang terdeteksi pada media dari biakan kontrol lebih parah (lebih gelap) daripada yang berasal dari perlakuan dehidrasi. Coklatnya jaringan dan media pada umumnya disebabkan oleh terjadinya oksidasi senyawa fenol yang disebabkan oleh enzim polifenol oksidase (PPO). HUANG *et al.* (2000) membuktikan bahwa pencoklatan berkorelasi positif dengan aktivitas PPO. Hasil percobaan ini menunjukkan bahwa oksidasi lebih tinggi terjadi pada biakan kontrol (pada awal masa inkubasi) dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Tingginya oksidasi senyawa fenol tersebut terbukti menghambat pertumbuhan apeks tebu. Namun, pada masa inkubasi berikutnya, pertumbuhan biakan kontrol lebih pesat daripada yang diberi perlakuan dehidrasi. Beberapa eksplan dari perlakuan dehidrasi tetap mencoklat dan tidak mampu bertahan hidup hingga 4 MST. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa peningkatan taraf PVP dari 100 menjadi 300 mg/l dapat meningkatkan daya regenerasi apeks tebu pascadehidrasi jaringan dengan larutan PVS2 (Gambar 2 dan 3). PVP merupakan sejenis antioksidan dan dalam penelitian ini terbukti mampu menekan terjadinya pencoklatan. Berdasarkan percobaan ini, diketahui bahwa perlakuan dehidrasi selama 30 menit menghasilkan daya hidup dan regenerasi, serta jumlah tunas yang cukup tinggi (masing-masing sebesar lebih dari 70% dan lebih dari 5 tunas/eksplan). Oleh karena itu, perlakuan dehidrasi selama 30 menit dipertimbangkan sebagai durasi terbaik untuk kriopreservasi apeks tebu PS864.



Keterangan: Notasi yang sama di atas grafik batang menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 10%.
 Note: The same notation on the top of bar chart means not significantly different based on 10% DMRT

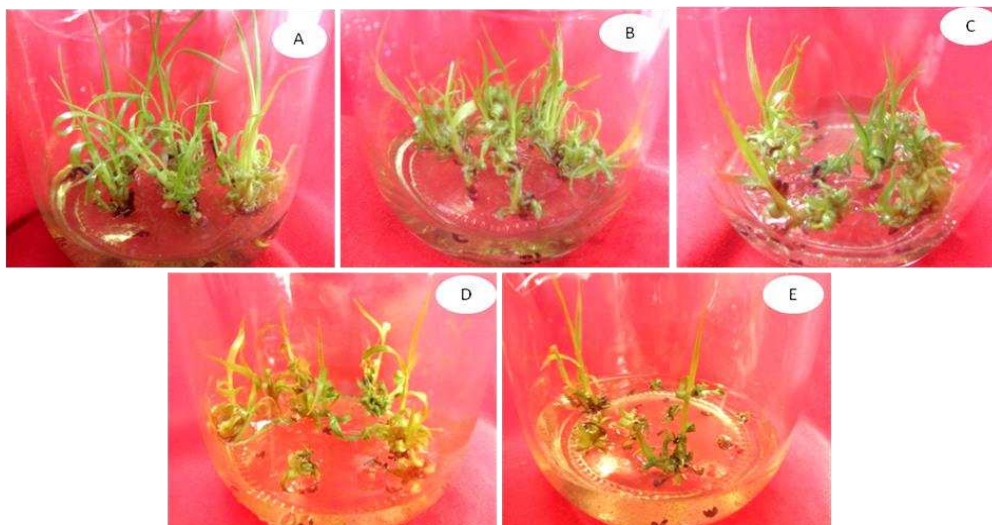
Gambar 1. Pengaruh durasi dehidrasi dalam larutan PVS2 terhadap daya hidup dan regenerasi, serta jumlah tunas yang terbentuk dari eksplan apeks tebu PS864 umur 1–4 MST

Figure 1. The effect of dehydration period by PVS2 solution to the survival and growth rate, and shoot number of sugarcane apexes of PS864 at 1–4 weeks after planting (WAP)



Gambar 2. Penampilan biakan tebu PS864 pada media regenerasi dengan kandungan PVP 100 mg/l, pascadehidrasi jaringan dalam larutan PVS2 selama durasi rendam 0 (A), 10 (B), 20 (C), 30 (D), dan 40 menit (E)

Figure 2. The performance of sugarcane cultures of PS864 on regeneration media containing of 100 mg/l PVP, postdehydration with PVS2 solution for 0 (A), 10 (B), 20 (C), 30 (D), and 40 minutes (E)



Gambar 3. Penampilan biakan tebu PS864 pada media regenerasi dengan kandungan PVP 300 mg/l, pascadehidrasi jaringan dalam larutan PVS2 selama durasi rendam 0 (A), 10 (B), 20 (C), 30 (D), dan 40 menit (E)

Figure 3. The performance of sugarcane cultures of PS864 on regeneration media containing of 300 mg/l PVP, postdehydration with PVS2 solution for 0 (A), 10 (B), 20 (C), 30 (D), and 40 minutes (E)

Optimasi Metode Pembekuan Jaringan Apeks

Hasil percobaan menunjukkan bahwa semakin tinggi taraf sukrosa pada tahap prakultur maka semakin tinggi pula daya hidup dan jumlah tunas yang terbentuk setelah perlakuan dehidrasi (Tabel 1). Dalam hal ini, daya tumbuh apeks setara dengan daya hidup apeks. PANIS *et al.* (2005) menyatakan bahwa perlakuan prakultur menyebabkan

penurunan kandungan air di dalam jaringan karena adanya tekanan osmosis, diiringi dengan penyerapan gula, sehingga meningkatkan konsentrasi cairan sitoplasma. Selain itu, prakultur dapat mempertahankan integritas membran dan struktur protein selama dehidrasi. Hasil penelitian ZHU *et al.* (2006) menunjukkan bahwa prakultur dapat mengubah komposisi gula (glukosa, fruktosa, sukrosa, rafinosa,

stachyosa, inositol, dan sorbitol), sterol (sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol), dan asam lemak (palmitat (C16:0), linoleat (C18:2), dan linolenat (C18:3)).

Hasil percobaan ini membuktikan bahwa kombinasi perlakuan prakultur dan pemuatan dapat meningkatkan toleransi jaringan apeks tebu terhadap cekaman dehidrasi dan suhu super rendah selama pembekuan dalam nitrogen cair (kriopreservasi). Kombinasi perlakuan prakultur dengan sukrosa 0,3 M dan pemuatan dengan larutan LS selama 10 menit merupakan perlakuan yang terbaik untuk pembekuan jaringan apeks tebu PS864. Dari kombinasi perlakuan tersebut, sebesar 40% apeks mampu bertahan hidup dan tumbuh pasca-pembekuan dalam nitrogen cair (Gambar 4). Hal serupa juga dikemukakan oleh ZHU *et al.* (2006) yang menyatakan prakultur merupakan tahapan penting untuk mendukung regenerasi biakan pasca-kriopreservasi dengan cara meningkatkan kandungan berbagai macam gula (glukosa, fruktosa, sukrosa, rafinosa, stasiosa, inositol, dan sorbitol) dan asam lemak total, serta mengubah rasio sterol. Gula merupakan komponen penting yang berperan dalam osmosis dan reduksi titik beku, pemelihara membran bilayer, dan penyetabil protein selama pembekuan. Sementara itu, sterol merupakan salah satu komponen penyusun membran sel dan berperan penting dalam stabilisasi dan permeabilitas membran sel. GAMEZ-PASTRANA *et al.* (2011) melaporkan perlakuan prakultur dapat menurunkan kalor yang dilepas dan suhu pembentukan inti kristal es pada saat pembekuan. Hal ini mengindikasikan bahwa perlakuan prakultur dapat meningkatkan keberhasilan kriopreservasi.

Eksplan yang bertahan hidup dan beregenerasi adalah yang diberi perlakuan dehidrasi dengan PVS2 selama 30 menit (Tabel 1 dan Gambar 4). Hasil penelitian GALLARD *et al.* (2008) juga menunjukkan bahwa perlakuan dehidrasi dengan PVS2 mutlak diperlukan untuk keberhasilan kriopreservasi *Pelargonium* sp. CONDELLO *et al.* (2011) dan MAŠLANKA *et al.* (2013) melaporkan perlakuan dehidrasi dapat meningkatkan daya hidup dan regenerasi eksplan pasca-pembekuan jaringan. DMSO merupakan salah satu komponen yang terkandung di dalam PVS2, selain gliserol, etilen glikol, dan sukrosa. Menurut MOMOSE *et al.* (2010), DMSO dapat meningkatkan ekspresi gen-gen yang terlibat di dalam sintesis protein dan asam lemak, pembentukan dinding sel, dan akumulasi senyawa dengan berat molekul rendah, seperti gliserol, arginin dan prolin. Dehidrasi jaringan dalam krioprotektan tidak hanya dapat menurunkan kerusakan sel pada saat proses pembekuan dan pelelehan, namun juga dapat meningkatkan daya pemulihan (*recovery rate*) jaringan.

Tingkat keberhasilan kriopreservasi pada penelitian ini adalah 40%. Namun, secara visual apeks yang telah dikriopreservasi mampu tumbuh dan bermultiplikasi sekitar 10 tunas/eksplan (Gambar 5). Untuk meningkatkan keberhasilan tersebut maka disarankan untuk menerapkan teknik pembekuan-pelelehan cepat secara droplet-vitrifikasi sebagaimana yang dilakukan oleh AGRAWAL *et al.* (2004) pada tanaman pisang karena teknik tersebut terbukti lebih baik daripada teknik pembekuan sederhana dan vitrifikasi.

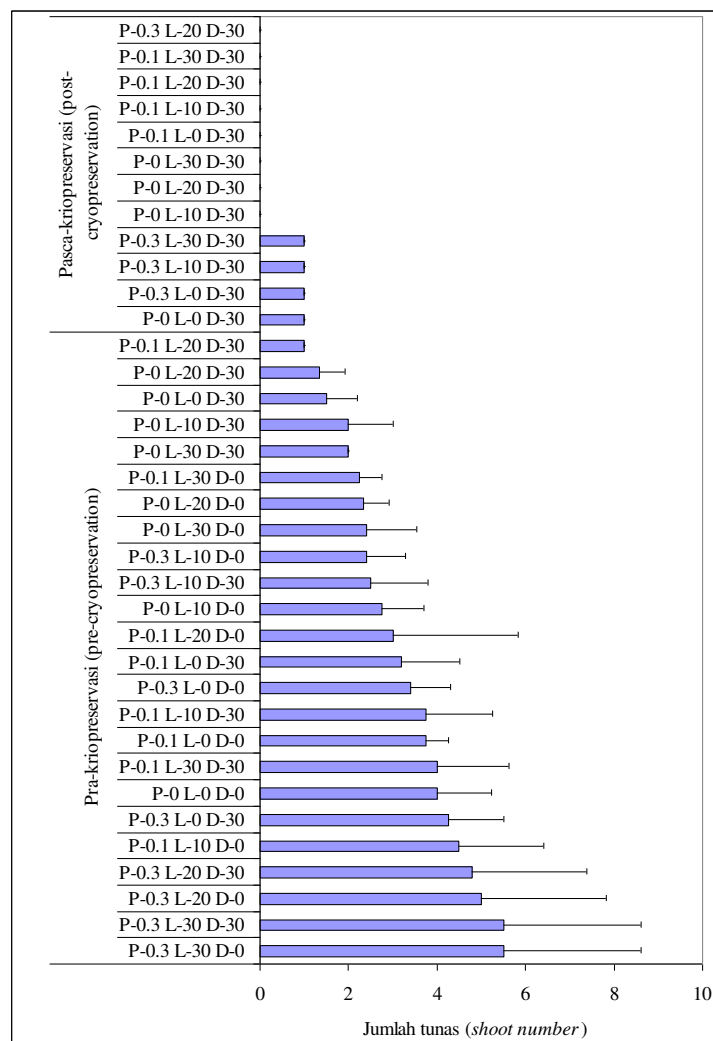
Tabel 1. Pengaruh kombinasi perlakuan prakultur dan pemuatan terhadap daya hidup yang dihasilkan dari apeks tebu PS864 pasca-kriopreservasi

Table 1. The effect of combined treatment of preculture and loading to the survival rate of sugarcane apexes of PS864 post-cryopreservation

Prakultur dengan sukrosa <i>Preculture with sucrose (M)</i>	Pemuatan dengan larutan LS (menit) <i>Loading with LS solution (minutes)</i>	Tanpa dehidrasi dengan larutan PVS2 <i>Without dehydration with PVS2 solution (%)</i>	Dehidrasi dengan larutan PVS2 selama 30 menit <i>Dehydration with PVS2 solution for 30 minutes</i>	
			-N ₂ (%)	+N ₂ (%)
0,0	0	100	40	20
	10	80	75	0
	20	60	60	0
	30	100	40	0
0,1	0	80	100	0
	10	80	80	0
	20	100	40	0
	30	100	80	0
0,3	0	100	80	20
	10	100	80	40
	20	100	100	0
	30	80	80	20

Keterangan: -N₂ adalah sebelum pembekuan dalam nitrogen cair; +N₂ adalah setelah pembekuan dalam nitrogen cair.

Note: -N₂ was before freezing in liquid nitrogen; +N₂ was after freezing in liquid nitrogen.

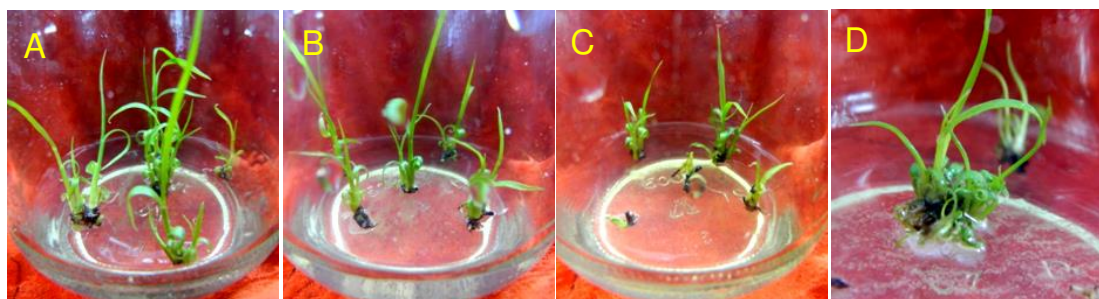


Keterangan: P = prakultur (0; 0,1; dan 0,3 M); L = loading (0, 10, 20, dan 30 menit); D = dehidrasi dengan PVS2 (0 dan 30 menit).

Note: P = preculture (0; 0.1; and 0.3 M); L = loading (0, 10, 20, 30 and 40 minutes); D = dehydration with PVS2 solution (0 and 30 minutes).

Gambar 4. Pengaruh kombinasi perlakuan prakultur dan pemuatan terhadap jumlah tunas yang dihasilkan dari apeks tebu PS864 pra dan pascakriopreservasi.

Figure 4. The effect of combined treatment of preculture and loading to the shoot number of sugarcane apexes of PS864 pre and postcryopreservation.



Gambar 5. Pertumbuhan apeks tebu PS 864 (3 MST) setelah beberapa tahapan perlakuan: prakultur (A), pemuatan (B), dehidrasi (C), dan pembekuan dalam nitrogen cair (D).

Figure 5. The growth of sugarcane apexes of PS864 (3 WAP) after several treatments: preculture (A), loading (B), dehydration (C), and freezing in liquid nitrogen (D).

KESIMPULAN

Durasi rendam dalam PVS2 selama 30 menit merupakan perlakuan yang terbaik untuk dehidrasi jaringan apeks tebu PS864. Kombinasi perlakuan prakultur dengan sukrosa 0,3 M dan pemuatan dalam larutan LS selama 10 menit merupakan metode yang terbaik untuk pembekuan jaringan apeks tebu PS864. Pada kondisi tersebut, apeks mampu bertahan hidup dan tumbuh hingga 100%, namun daya hidupnya menurun menjadi 40% pasca-pembekuan dalam nitrogen cair. Setelah kriopreservasi, biakan mampu tumbuh dengan tingkat multiplikasi tunas sekitar 10 tunas/eksplan. Ini merupakan publikasi pertama kali di Indonesia atas keberhasilan kriopreservasi pada tanaman tebu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian (Balitbang Pertanian) yang telah menyediakan dana penelitian ini melalui Program KKP3N dengan nomor register 810/LB.620/I.1/2/2013.

DAFTAR PUSTAKA

- AGRAWAL, A., R. SWENNEN, and B. PANIS. 2004. A comparison of four methods for cryopreservation of meristem in banana (*Musa* spp.). *CryoLetters* 25:101-110.
- CONDELLO, E., E. CABONI, E. ANDRE, B. PIETTE, P. DUART, R. SWENNEN, and B. PANIS. 2011. Cryopreservation of apple *in vitro* axillary buds using droplet-vitrification. *CryoLetters*. 32(2): 175-185.
- FENG, C., Z. YIN, Y. MA, Z. ZHANG, L. CHEN, B. WANG, and B. LI. 2011. Cryopreservation of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) and its pathogen eradication by cryotherapy. *Biotechnology Advances*. 29: 84-93.
- GALLARD, A., B. PANIS, N. DORION, R. SWENNEN, and A. GRAPIN. 2008. Cryopreservation of *Pelargonium* apices by droplet-vitrification. *CryoLetters*. 29(3): 243-251.
- GAMEZ-PASTRANA, R., M.T. GONZALEZ-ARNAO, and Y. MARTINEZ-OCAMPO. 2011. Thermal events in calcium alginate beads during encapsulation dehydration and encapsulation-vitrification protocols. *Dalam: B. Panis and P. Lynch (Eds).* Proceedings of The First Symposium on Cryopreservation in Horticultural Species. ISHS Comission Molecular Biology and *In Vitro* Culture. Belgium. Pp. 47-54.
- GOLMIRZAIE, A.M and A. PANTA. 2000. Advances in Potato Cryopreservation at the International Potato Center, Peru. *Dalam: F. Engelmann and H. Takagi (Eds.)* Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm - Current Research Progress and Applications. International Plant Genetics Resources Institute (IPGRI). Pp. 250-254.
- HUANG, L-C, Y-L. LEE, B-L.HUANG, C-I. KUO, and A-F. SHAW. 2002. High polyphenol oxidase activity and low titratable acidity in browning bamboo tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 38: 358-365.
- KELLER, E.R., A. KACZMARCZYK, and A. SENULA. 2008. Cryopreservation for plant genebanks - a matter between high expectations and cautious reservation. *Cryo Letters*. 29: 53-62.
- LEUNUFNA, S. 2004. Improvement of the *in vitro* maintenance and cryopreservation of yams (*Dioscorea* spp.) (Dissertation). Martin Luther Universitat Halle-Wittenberg. Berlin. 120 p.
- MAŚLANKA, M.B. PANIS, and A. BACH. 2013. Cryopreservation of *Galanthus elwesii* Hook. apical meristems by droplet vitrification. *CryoLetters*. 34(1): 1-9.
- MOMOSE, Y., R. MATSUMOTO, A. MARUYAMA, and M. YAMAOKA. 2010. Comparative analysis of transcriptional responses to the cryoprotectants, dimethyl sulfoxide and trehalose, which confer tolerance to freeze-thaw stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cryobiology*. 60: 245-261.
- PANIS, B. and N.T. THINH. 2009. Cryopreservation of *Musa* Germplasm. Kota penerbit: INIBAB Technical Guidelines. Rome-Italy. 44 p.
- PANIS, B., B. PIETTE, and R. SWENNEN. 2005. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. *Plant Science*. 168: 45-55.
- PUTRA, L.K. dan T.A DAMAYANTI. 2009. Penyakit *streak mosaic* pada tebu di Indonesia: survei lapang, deteksi virus, uji penularan, kisaran inang, dan ketahanan varietas. *MPG* 45(1): 19-35.
- REINHOUD, P.J., F.V. IREN, and J.W. KIJNE. 2000. Cryopreservation of Undifferentiated Plant Cells. *Dalam: F. Engelmann and H. Takagi (Eds.)*. Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application. IPGRI. Rome-Italy. Pp. 91-102.
- ROOSTIKA, I. dan I. MARISKA. 2004. Pemanfaatan teknik kriopreservasi dalam penyimpanan plasma nutfah tanaman. *Buletin Plasma Nutfah*. 9(2): 10-18.
- ROOSTIKA, I., R. MEGIA, dan I. DARWATI. 2007. Kriopreservasi tanaman purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.) dengan teknik vitrifikasi. *Berita Biologi*. 8(6): 429-431.
- SHATNAWI, M., G. ANFOKA, R. SHIBLI, M. AL-MAZRA'AWI, W. SHAHROUR, and A. AREBIAT. 2011. Clonal propagation and cryogenic storage of virus-free grapevine (*Vitis vinifera* L.) via meristem culture. *Turk. J. Agric. For*. 35: 173-184.
- WANG, Q. and J.P.T. VALKONEN. 2012. Cryopreservation of shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends in Science* 14(3): 119-122.
- WANG, Q., M. MAWASSI, P. LI, R. GAFNY, I. SELA, and E. TANNE. 2003. Elimination of *Grape vine virus A* (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. *Plant Science*. 165: 321-327.
- ZHU, G-Y, J.M.C. GEUNS, S. DUSSERT, R. SWENNEN, and B. PANIS. 2006. Change in sugar, sterol and fatty acid composition in banana meristems caused by sucrose-induced acclimation and its effects on cryopreservation *Physiologia Plantarum*. 128: 80-94.

